

产品简介

T4 DNA Ligase 可催化 dsDNA 平末端或粘性末端相邻核酸的 5'磷酸末端和 3'羟基末端形成磷酸二酯键，该催化反应需 ATP 作为辅助因子。还可修补双链 DNA、双链 RNA 或 DNA/RNA 杂合物上的单链缺口，但不能催化全单链核苷酸连接。适用于标记 RNA 3'-末端，环化 RNA 和 DNA 寡聚核苷酸以及克隆 cDNA 等核酸操作。

产品组成

组分	M101 (40,000 U)	M101 (80,000 U)
T4 DNA Ligase (800 U/μl)	50 μl	100 μl
10 × T4 DNA Ligase Buffer	200 μl	400 μl

储存条件

-20°C保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

单位定义

在 20 μl 的连接反应体系中，6 μg 的 λDNA-Hind III 的分解物在 16°C下反应 30 分钟时，有 90%以上的 DNA 片段被连接所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C下孵育 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37°C温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C下孵育 30min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：50 μl 体系中，以本品为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

实验流程

1. 在微量离心管中制备下列连接反应液。

10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
DNA 片段 ^{*1}	约 0.3 pmol
载体 DNA ^{*2}	约 0.03 pmol
T4 DNA Ligase	1.0 μl
ddH ₂ O	up to 20 μl

^{*1} DNA 片段的摩尔数应控制在载体 DNA 摩尔数的 3~10 倍。

^{*2} 平滑末端的载体与 DNA 片段进行连接时，应首先将载体进行去磷酸化处理，以防止其自身环化。

2. 16°C 过夜反应。

3. 10~20 μl 转化至 100 μl 的感受态细胞中。